

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1940

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre DESGREZ

Né le 6 janvier 1909, à Paris

Étude de l'Action de l'Eau régale
sur les Composés biochimiques soufrés :
Application au dosage du Soufre urinaire

Président : M. POLONOVSKI, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1940

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1940

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre DESGREZ

Né le 6 janvier 1909, à Paris

Étude de l'Action de l'Eau régale
sur les Composés biochimiques soufrés :
Application au dosage du Soufre urinaire

Président : M. POLONOVSKI, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1940

DOYEN... TIFFENEAU

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	R. DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale	MONDOR.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	LOEPER.
Clinique médicale	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
Clinique ophtalmologique	LENORMANT.
Clinique urologique	TERRIEN.
	CHEVASSU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	LÉVY-SOLAL.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	MOCQUOT.
Clinique thérapeutique médicale	OMBREDANNE.
Clinique oto-rhino-laryngologique	RATHERY.
Clinique thérapeutique chirurgicale	LEMAITRE.
Clinique propédeutique	Pierre DUVAL.
Clinique de la tuberculose	Maurice VILLARET
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	TROISIER.
Clinique de cardiologie	MATHIEU.
Clinique de neuro-chirurgie	LAUBRY.
Assistance médico-sociale	Clovis VINCENT.
	N...
Professeurs sans chaire	HAZARD.
	HOVELACQUE.
	MULON.
	OLIVIER.
	SANNIÉ.
	VERNE

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

AMELINE Pathologie chirurgicale.
 BARIÉTY Pathologie médicale.
 BÉNARD (H.) .. Pathologie médicale.
 BERNARD (E.). Pathologie médicale.
 BESANÇON (J.). Hydrologie.
 BOULIN Pathologie médicale.
 BULLIARD Histologie.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHEVALLIER .. Pathologie médicale.
 COSTE Pathologie médicale.
 DOGNON Physique.
 FEY Urologie.
 FUNCK Pathologie chirurgicale.
 GALLIARD Parasitologie.
 GASTINEL Bactériologie.
 DE GAUDART D'ALLAINES.. Pathologie
 chirurgicale.
 GAYET Physiologie.
 DE GENNES ... Pathologie médicale.
 GIROUD Histologie.
 HAGUENAU ... Pathologie médicale.
 HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
 HUGUENIN Anatomie pathologique.
 JOANNON Hygiène.

MM.

LACOMME Obstétrique.
 LANTUÉJOUL .. Obstétrique.
 LAROCHE (G.).. Pathologie médicale.
 LAVIER Parasitologie.
 LELONG Pathologie médicale.
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 M^{lle} J. LÉVY.... Pharmacologie.
 LÉVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MÈNÉGAUX ... Pathologie chirurgicale.
 MOLLARET ... Pathologie médicale.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET.. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 PETIT-DUTAILLIS.. Pathologie chirurgi-
 cale.
 PIÉDELIEVRE .. Médecine légale.
 PORTES Obstétrique.
 RENARD Ophtalmologie.
 RICHET Physiologie.
 SÈNÈQUE Pathologie chirurgicale.
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
 BUSQUET Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT.. Physiologie.
 GUÉNIOT..... Obstétrique.
 HEITZ-BOYER... Pathologie chirurgicale.

MM.

LARDENNOIS ... Pathologie chirurgicale.
 LE LORIER Obstétrique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
 SCHWARTZ..... Pathologie chirurgicale.
 VAUDESCAL..... Obstétrique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ALAJOUANINE.	}	BASSET.	}
AUBERTIN.		BROCQ.	
BRULÉ.		CADENAT.	
CHABROL.		GATELLIER.	
DONZELOT.		MOURE.	
DUVOIR.		QUENU.	
LIAN.		VELTER.	
VALLERY-RADOT (Pasteur).			
SEZARY.			

MM.	}	
ÉCALLE.		Clinique obstétricale.
METZGER.		

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE VÉNÉRÉE DE MON PÈRE

ALEXANDRE DESGREZ

Professeur à la Faculté de Médecine
Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

A LA CHÈRE MÉMOIRE DE MA SŒUR

JEANNE DESGREZ

Docteur en Médecine

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL POLONOVSKI

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de la reconnaissance et de la respectueuse
affection de son élève dont l'éloignement ne
saurait altérer l'attachement profond.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR RANGIER

Chef de Travaux à la Faculté de Médecine

*En qui nous avons trouvé un maître et
un ami.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR CAMILLE LEFÈVRE

Ancien Président de la Société de Pharmacie de Paris

*Dont les conseils si précieux nous permirent
de mener à bien le présent travail.*

Étude de l'Action de l'Eau régale sur les Composés biochimiques soufrés : Application au dosage du Soufre urinaire

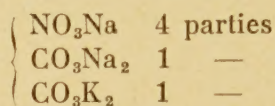
Introduction.

Le dosage du soufre total dans les urines des glycosuriques est pratiquement impossible à réaliser par les méthodes actuelles. Le dosage des sulfates s'effectue par précipitation avec une solution de chlorure de baryum, filtration et pesée du sulfate de baryum obtenu. Le dosage des esters-sulfates s'effectue d'une manière identique : après hydrolyse avec de l'acide chlorhydrique à l'ébullition, on obtient par le chlorure de baryum un précipité de sulfate qui représente la somme des sulfates et des esters-sulfates. Le poids du soufre correspondant aux esters-sulfates s'obtient par différence en retranchant du chiffre obtenu le poids des sulfates proprement dits.

Si le dosage du soufre des sulfates et des esters-sulfates que l'on appelle encore soufre complètement oxydé ne présente aucune difficulté avec les urines riches en sucre, il n'en est pas de même pour ce que l'on appelle le soufre neutre, soufre organique, soufre incomplètement oxydé (Salkowski) et que l'on obtient après oxydation totale de l'urine de manière à transformer tout le soufre en acide sulfurique.

Du chiffre obtenu, en retranchant le poids de soufre correspondant aux sulfates et aux esters-sulfates, on obtient, par différence, le soufre organique ou soufre incomplètement oxydé.

La difficulté de l'opération réside dans l'oxydation complète de l'urine. La seule méthode clinique, actuellement en usage, consiste à évaporer 100 cc d'urine au bain-marie en présence du mélange suivant :



et à calciner ensuite le mélange au four à moufle après avoir ajouté une nouvelle proportion de mélange fondant.

Avec les urines des glycosuriques, cette calcination est pratiquement impossible : la masse sucrée, riche en carbone, provenant de l'évaporation de l'urine, se boursoufle, charbonne, s'enflamme en même temps qu'il se produit des déflagrations entraînant la perte de corps soufrés, voir le bris de la capsule de porcelaine dans laquelle on opère.

Pour essayer d'obvier à ces inconvénients, nous avons remplacé le carbonate de potassium, dans le mélange fondant, par une quantité équivalente de carbonate de sodium. Mais, si les défauts de la méthode que nous venons de citer sont légèrement atténués, ils n'en subsistent pas moins et l'opération n'est pas sensiblement améliorée.

Donc, pertes de substance soufrée et bris des capsules lors de la calcination ; tels sont les deux inconvénients que l'on rencontre au cours du dosage du soufre organique.

Nous verrons d'ailleurs que cette calcination est cependant inévitable pour transformer tout le soufre organique en acide sulfurique.

C'est pour cette raison que nous avons entrepris nos recherches, dans le but de donner un procédé à la fois clinique et exact du soufre organique urinaire, en particulier dans les urines des glycosuriques.

But et plan de ce travail.

Nous exposerons dans le chapitre I après avoir rapidement passé en revue, les procédés actuels de dosage du soufre urinaire, les substances soufrées que l'on rencontre dans l'organisme humain ; nous dirons quelques mots du métabolisme du soufre, puis, des corps soufrés qui ont été découverts dans l'urine. Cet aperçu sommaire de la biologie du soufre nous permettra la discussion et la mise au point de notre dosage.

Dans le chapitre II, nous étudierons l'action de l'eau-régale comme agent de destruction préliminaire sur une série de corps organiques soufrés et les produits auxquels on est conduit comme première étape intermédiaire de l'oxydation.

Le chapitre III sera consacré à l'étude de la méthode au permanganate alcalin, cet oxydant agissant après l'action préliminaire de l'eau régale.

Dans le chapitre IV, nous étudierons la méthode par fusion oxydante alcaline comme seconde étape de l'oxydation.

Enfin, dans le chapitre V, seront sommairement exposées les raisons pour lesquelles, ni la méthode permanganique ni celle par calcination ne peuvent être généralisées au dosage du soufre dans les substances biologiques.

CHAPITRE I

Les procédés actuels de dosage du soufre urinaire.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord exposer sommairement les différents procédés de dosage du soufre urinaire.

Le principe en est toujours l'oxydation de la substance dans le but de transformer le soufre en acide sulfurique que l'on dose soit pondéralement, après transformation en sulfate de baryum, soit volumétriquement, après transformation en sulfate de benzidine insoluble que l'on évalue en retour, à l'aide d'une solution alcaline titrée. Or, cette oxydation du soufre est difficile à réaliser si l'on veut atteindre une oxydation complète et sans pertes. Il n'existe, pour ainsi dire, qu'une seule méthode qui réalise cette transformation, c'est celle de Carius, consistant à chauffer en tube scellé la substance soufrée avec de l'acide azotique.

Mais son application, possible en chimie organique, ne saurait être étendue au dosage du soufre urinaire, en raison du volume de la prise d'essai, nécessairement important, d'une part et, puisqu'il s'agit de diabétiques, de la présence du glucose, qui rendrait l'opération dangereuse, d'autre part.

Dans l'exposé critique qui va suivre, et qui n'a pour but que l'adaptation d'un procédé d'oxydation à l'urine, nous n'indiquerons que les principes des méthodes les plus usuelles :

Une des premières en date est celle de Salkowski (1, 2 et 3) applicable au dosage du soufre dans l'urine, qui consiste à calciner en présence de soude et de nitrate de sodium dans une capsule en platine. Depuis cette date, malgré les nom-

breux procédés de dosage que nous allons indiquer, la méthode la plus couramment employée est encore celle de Salkowski : on calcine dans une capsule de porcelaine, seule varie la composition chimique de l'agent d'oxydation : azotate de potassium, carbonate de sodium et carbonate de potassium en différentes proportions.

La méthode de Mohr (4) pour le dosage du soufre urinaire consiste à traiter l'urine en présence d'acide chlorhydrique par l'acide azotique fumant. On chauffe au bain-marie, on reprend par l'eau et on précipite le soufre à l'état de sulfate de baryum.

Schulz (5) utilise un procédé de destruction identique avec quelques modifications concernant les volumes d'acides azotique et chlorhydrique employés dans la méthode de Mohr.

Konschegg (6) ajoute de l'azotate de potassium au mélange des acides précédents pour doser le soufre urinaire. Bauzil (7) modifie la méthode de Mohr de la façon suivante : il fait bouillir l'urine en présence d'acide chlorhydrique et de chlorate de potassium pour doser le soufre incomplètement oxydé. Le soufre complètement oxydé est obtenu par traitement préliminaire des urines par le chlorure de calcium et le carbonate de sodium, ébullition du filtrat avec de l'acide chlorhydrique, puis addition d'acétate de sodium.

Le principe de la méthode de Benedict (8) consiste à oxyder l'urine par une solution d'azotate de cuivre et de chlorate de potassium. Après évaporation du liquide, on calcine le résidu.

Denis (9) a modifié la méthode de Benedict en faisant varier les quantités respectives des oxydants utilisés, mais le principe de l'oxydation reste le même. Dans tous les cas, le résidu est repris par l'eau chlorhydrique et l'acide sulfurique précipité à l'état de sulfate de baryum.

Konarsky (10) utilise une méthode très analogue à celle de Benedict, mais ajoute de l'acide azotique avant de chauffer le résidu au rouge.

Modrakowski (11) a utilisé, le premier, pour le dosage du soufre urinaire, le peroxyde de sodium comme agent d'oxy-

dation. On opère d'abord par voie humide, puis, après évaporation, on ajoute à nouveau du peroxyde de sodium et on calcine. La calcination s'effectue dans un creuset en métal.

Osborne (12) et Folin (13) opèrent cette fusion dans un creuset de nickel. Pendant la calcination le métal est attaqué, mais l'excès d'acide chlorhydrique permet la précipitation totale de l'acide sulfurique à l'état de sulfate de baryum.

Abderhalden et Funk (14) utilisent le peroxyde de sodium en présence de soude et de lactose.

Quelques auteurs, en particulier Cordier (15), calcinent le résidu de l'évaporation de l'urine après l'avoir additionné d'un mélange de soude, de nitrate de sodium, de nitrate de potassium, de nitrate de magnésium et de carbonates alcalins.

Stockholm et Koch (16) oxydent l'urine à l'aide de mélanges d'acide nitrique et d'eau oxygénée. Doumer et Limozin (17) ont indiqué un dosage du soufre neutre en utilisant l'électrolyse.

Sherman (18) recourt pour doser le soufre à l'oxygène sous pression. On place le produit de l'évaporation dans une sorte de bombe en communication avec un générateur d'oxygène. L'oxydation s'effectue sous une pression de 25 à 30 atmosphères.

Wolf et Oesterberg (19) traitent l'urine par l'acide azotique fumant, puis par un mélange d'azotate de cuivre et de chlorate de potassium; après évaporation le résidu est calciné.

Certains auteurs, à l'exemple d'Atwater, ont employé pour les matières alimentaires, le calorimètre de Berthelot, en utilisant des pressions de 25 atmosphères. Nous n'entrerons pas dans les détails de cette opération qui est extrêmement compliquée.

Romani (20) utilise comme oxydant le peroxyde d'hydrogène à froid, puis à l'ébullition en présence de bioxyde de manganèse.

Avery (21) a employé une solution saturée de potasse et une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %.

Lœper, Lesure et Dunez (22), Thomas (23) utilisent, pour le soufre urinaire, l'oxydation par le mélange acide nitrique et perhydrol ou acide nitrique et perchlorique. Ils terminent le dosage par la méthode à la benzidine.

Folin (24), Liebesny (25) et R. Robison (26) conseillent l'emploi d'une lampe à alcool pour minéraliser le résidu de l'urine en présence de l'oxydant qui, pour Robison, sera une solution aqueuse de nitrate de cuivre cristallisé et de chlorure cuivrique.

Denis et Reed (27) opèrent par néphélémétrie après oxydation par un réactif contenant du nitrate de zinc, du chlorure de sodium et du chlorure d'ammonium.

Boutwell-Toepfer (28) utilise le pouvoir oxydant du mélange acide nitrique et acide perchlorique. Reval et Ferland (29) emploient soit ce mélange, soit le mélange nitroperhydrique pour minéraliser, les produits volatils étant oxydés dans un barboteur à brome. Friedrich Bauer (30) oxyde le soufre urinaire par le brome et l'acide azotique.

Enfin, Warth et Krishnau (31) proposent une double évaporation, d'abord en présence d'acide azotique, puis de soude.

* * *

Toutes ces méthodes présentent les mêmes inconvénients que la méthode classique de Salkowski décrite au début de ce travail. Quel que soit l'agent d'oxydation, la fusion occasionne fréquemment le bris des capsules et des déflagrations rendant les méthodes inutilisables.

En ce qui concerne la transformation du soufre en acide sulfurique par voie humide. MM. C. Lefèvre et M. Rangier (32) en étudiant l'action des oxydants usuels de laboratoire directs ou indirects, à chaud ou à froid, sur les différentes fonctions soufrées sont arrivés aux conclusions suivantes : les corps dans lesquels le soufre est directement uni à l'oxygène sont particulièrement stables vis-à-vis des oxydants. Le groupement sulfuryle— SO_2 —confère à la molécule une résistance variable à l'oxydation et, si l'on compare entre eux les corps qui le contiennent, on constate

que les sulfones $R_1-SO_2-R_2$ (alcoylées ou arylées) sont pratiquement inattaquables par voie humide. Dans le groupe des acides sulfoniques $R-SO_2-OH$, la résistance à l'oxydation augmente avec la présence dans la molécule des groupements aminés $-NH_2$, plus ou moins voisins du sulfuryle $-SO_2-$. C'est ainsi que l'acide o. oxybenzène-sulfonique est légèrement oxydé à froid par l'eau régale, tandis que l'acide para-aminobenzène sulfonique et la taurine sont presque inattaqués.

Tous les produits dans lesquels le soufre n'est pas uni à l'oxygène, autrement dit tous les corps qui ne renferment pas dans leur molécule les groupements thionyles ou sulfuryles sont facilement oxydés, quelquefois même à froid.

La meilleure méthode de dosage du soufre est celle au permanganate alcalin.

La transformation quantitative du soufre en acide sulfurique est plus ou moins rapide suivant la constitution chimique des corps que l'on veut oxyder, rapide pour les corps ne renfermant pas de groupements thionyles ou sulfuryles (sulfo-cyanures, sulfo-urée), plus lente pour les dérivés sulfoniques (taurine, acide para-aminobenzène-sulfonique, etc...), mais toujours quantitative ; seules les sulfones $R_1-SO_2-R_2$, R_1 et R_2 étant des radicaux alcoylés ou arylés, restent pratiquement inattaqués.

Ayant adopté les conclusions de ces auteurs, nous mettrons à profit, dans ce qui va suivre, cette méthode au permanganate alcalin comme méthode de contrôle.

En effet, il serait illusoire de vouloir établir une méthode pratique au permanganate alcalin seul pour doser le soufre urinaire, même celui des urines normales. Les opérations sont longues, utilisant des quantités considérables de réactif, surtout avec les urines glycosuriques. Pour cette raison, nous avons été amenés à étudier l'action d'un agent de destruction préliminaire, l'eau régale, sur une série de corps soufrés, en particulier ceux que l'on rencontre en biologie, cet agent de destruction ayant pour but essentiel la destruction du glucose urinaire et de la plus grande

partie des matières organiques. Les corps intermédiaires de l'oxydation par ce mélange oxydant ayant été définis en les classant par espèces chimiques, il sera facile de se rendre compte des transformations que subira le soufre dans l'oxydation consécutive.

Quoi qu'il en soit, c'est l'action de l'eau régale sur une série de corps organiques soufrés qui nous a conduit à mettre au point un procédé de dosage par le mélange oxydant alcalin dans des conditions que nous allons préciser.

*
* * *

**Les substances soufrées que l'on rencontre
dans notre économie.
Métabolisme du soufre.
Déchets urinaires soufrés.**

Les substances soufrées que l'on rencontre dans notre économie peuvent être groupées dans le tableau suivant :

A. Sulfates minéraux, principalement sels de sodium et de potassium (sang, humeurs et tous les tissus).

Un petit nombre de sulfures ont été rencontrés dans le courant sanguin ainsi que des hyposulfites.

Il existe aussi des esters-sulfates sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir en étudiant les déchets urinaires soufrés.

Les sulfocyanates sont présents dans la salive et constituent aussi une très faible proportion du soufre neutre sanguin.

Citons, pour mémoire, l'ergothionéine de Tanret, isolée en 1905 de l'ergot de seigle et décelée par Benedict, Newton et Behre dans le sang de certains animaux. Sa présence n'a pas encore été signalée dans le sang de l'homme.

Les sulfatides qui ont été rencontrés dans la substance cérébrale par Levene et ont pu être obtenus cristallisés par Koch, constituent un ensemble de corps assez mal définis. Le soufre y serait complètement oxydé.

C'est à ce groupe qu'appartiennent les jécorines de Mayer qui seraient, d'après cet auteur, des sulfo-glucolécithines et les protagonistes de Lubreich.

Les mucines que l'on rencontre dans la synovie, les glandes salivaires, le tissu conjonctif, les tendons, les cartilages et certains liquides pathologiques (kystes muqueux) sont des glucoprotéines dont le groupement prosthétique est l'acide mucoïne-sulfurique.

Les mucinoïdes (ovomucoïde du blanc de l'œuf d'oiseau, mucoïdes des kystes ovariens, substance amyloïde) sont des glucoprotéines dont le groupement prosthétique est l'acide chondroïne-sulfurique.

Ce groupe correspond à du soufre complètement oxydé ; une hydrolyse plus ou moins poussée de ces substances libère, en effet, de l'acide sulfurique facile à doser.

B) Nous y classerons le soufre incomplètement oxydé. Jusqu'à ce jour, aucune sulfone correspondant au groupe $R_1-SO_2-R_2$ n'a été décrite. Il n'existe que le type sulfonique $R-SO_3-H$ qui est représenté par la taurine, particulièrement abondante dans la bile, sous la forme de combinaison avec l'acide cholalique qui porte le nom d'acide taurocholique et fut décrite par Strecker en 1848.

C) Enfin, dans ce troisième groupe, nous rencontrons les composés se rattachant au soufre neutre, c'est-à-dire celui dans lequel le soufre n'est pas uni à l'oxygène.

Les protéines soufrées renferment environ 2% de soufre ; les scléroprotéines qui constituent les productions épidermiques (kératines et mélanines) en contiennent jusqu'à 5%.

Ces substances fournissent à l'hydrolyse un acide aminé particulièrement important, la cystine, découverte par Wolleston, en 1810, dans l'urètre d'un nouveau-né.

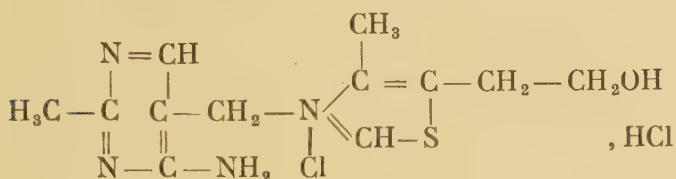
C'est un acide aminé essentiel, c'est-à-dire un de ces corps qui doivent être fournis à l'organisme pour assurer son entretien et sa croissance (Osborne et Mendel). On lui donne quelquefois le nom d'aliment soufré.

La méthionine, ou acide α amino γ méthyl-thiobutyrique, a été isolée récemment parmi les produits d'hydrolyse enzymatique de la caséine par Mueller et identifiée par Barger.

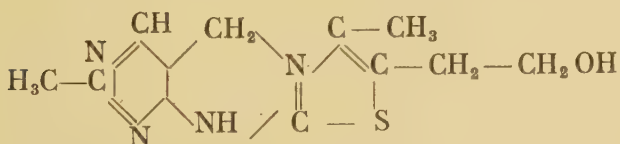
La moitié du soufre de la caséine (3,5 %) correspondrait à cet acide aminé dont la présence a été également signalée dans la kératine de la corne, l'ovalbumine (4,47 %), la lactalbumine (2,6 %), la fibrine (2,4 %), la zéine (2,4 %), l'édestine (2,1 %), la gliadine (2 %), l'arachine (0,5 %) et dans presque toutes les substances protéiques, d'après Baerstein, surtout celles d'origine animale.

Si la cystine est un corps peu soluble dans l'eau, en revanche, la méthionine se présente comme un corps cristallisé, soluble. Son rôle biologique est resté assez obscur. On sait seulement qu'elle a une action favorable sur le développement des jeunes animaux.

D'autres composés correspondant à du soufre neutre, ont été signalés en biologie. Nous citerons, l'acide thiolactique dont la présence a été signalée par Suter dans l'hydrolyse de la corne, puis par Friedman dans celle des cheveux. Enfin, la vitamine B, antibériberique qui (Windaus, Tscherche et Greive) est un dérivé du thiazol de formule :



et son dérivé d'oxydation (Barger), le thiochrome :



isolé par Kuhn de la levure.

Quoi qu'il en soit, tous ces composés, correspondant à du soufre neutre, seront directement dosables par le permanganate alcalin.

Il existe aussi des polypeptides soufrés, tels que l'insuline et le glutathion, qui donnent à l'hydrolyse de la cystine, c'est-à-dire, sont des corps à soufre non oxydé.

Des thiopolypeptides ont été décrits renfermant le groupement soufre neutre — CS-NH, et certaines protéines renfermant, indépendamment des différentes formes de soufre neutre que nous avons signalées, une autre variété de soufre de nature inconnue qui se détache facilement sous l'influence de l'ébullition avec les alcalis, et que l'on appelle le soufre faiblement combiné, cette dernière variété sera très facilement oxydable par le permanganate alcalin.

* * *

Métabolisme du soufre.

La question du métabolisme du soufre est loin d'être complètement élucidée et, malgré les nombreux travaux qu'elle a suscités, on en est encore réduit aux hypothèses sur bien des points.

On sait cependant, à l'heure actuelle, que l'organisme ne peut assimiler que le soufre protidique. Il lui est apporté presque uniquement par l'alimentation, une très faible part revenant au soufre d'origine endogène provenant de différents processus de désassimilations cellulaires : cytolysse, protéolyse, hémolyse (Loëper et collab.).

Les sulfates minéraux absorbés n'ont guère qu'une action limitée à leurs propriétés physiques ou à celles des ions métalliques que comporte leur molécule.

L'élément organique soufré assimilable le plus important à considérer dans ce métabolisme est la cystine, acide aminé essentiel, qui, libérée par les diastases digestives, va être absorbée par la muqueuse intestinale et utilisée au cours de la synthèse des protéines soufrées de l'organisme.

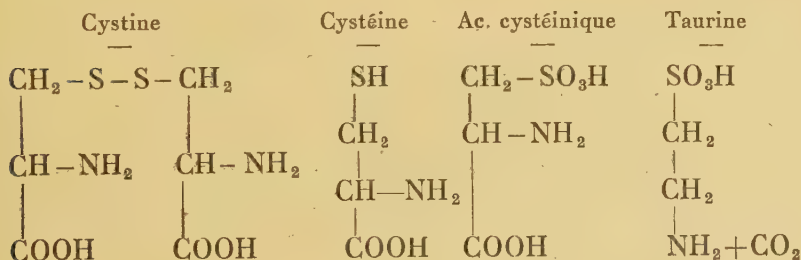
À côté de ce rôle éminemment plastique, la cystine entre dans la constitution de certaines hormones, l'insuline en particulier, et on connaît trop son rôle dans les phénomènes d'oxydo-réduction tissulaires où elle intervient enga-

gée dans une combinaison tripeptidique, le glutathion, pour que nous y insistions ici.

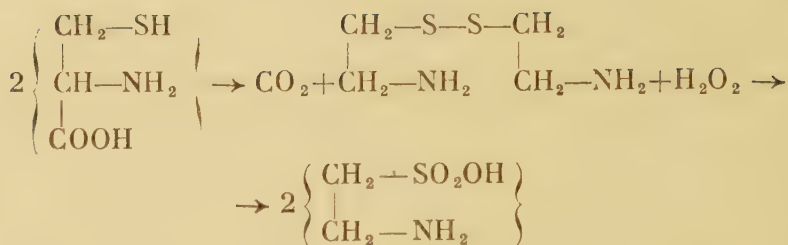
Un certain nombre d'organes jouent probablement un rôle important dans le métabolisme du soufre, mais, actuellement, on ne commence à avoir quelques précisions que sur deux d'entre eux : les surrénales et le foie.

Les surrénales auraient, avant tout, une fonction thiopeptique importante, on y trouve, en effet, une quantité relativement considérable de soufre (3,66 % de substance sèche, d'après Aufrecht et Driesing) dont 80 % environ reviendrait au soufre neutre (Loeper et collab.) sous forme de glutathion en particulier (Blanchetière et Binet).

Le foie, un peu moins riche en soufre que les surrénales, jouerait un rôle beaucoup plus actif. Il est en effet capable, non seulement d'emmagasiner le soufre sous ses différentes formes, mais aussi de le transformer, par oxydation d'une partie de ses dérivés organiques, en acide sulfurique pour donner des sulfates et des esters-sulfates par combinaison avec certains dérivés aromatiques, légèrement toxiques, formés dans le gros intestin par action microbienne sur les protéines. C'est également dans le foie que la cystine va se transformer par oxydation et décarboxylation en taurine suivant une série de réactions que l'on peut schématiser par les formules suivantes :



Cependant Schöberl admet plutôt le passage par la cystamine :



On sait que la taurine est un des constituants principaux de la bile où elle se trouve combinée à l'acide cholalique pour former l'acide taurocholique.

Enfin, les sulfocyanures que l'on rencontre dans la bile, dans la salive et quelquefois aussi dans l'urine et le sang, semblent provenir de la transformation des cyanures, produits de déchets des protéines, rendus ainsi moins toxiques.

Telles sont brièvement exposées nos connaissances sur le métabolisme intermédiaire du soufre. Quant à la méthionine, son rôle, bien que primordial demeure assez mal déterminé à l'heure actuelle.

Acide aminé indispensable, il peut remplacer la cystine dans l'alimentation, et, phénomène curieux, se transformer en cystéine dans l'organisme, comme l'ont définitivement démontré les recherches de Schoenheimer et de ses collaborateurs, effectuées à l'aide d'une méthionine dont le soufre utilisé était l'isotope S³⁵.

* * *

Les déchets urinaires soufrés.

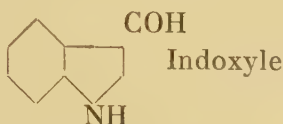
Le rein constitue la voie la plus importante d'excrétion des termes ultimes du métabolisme du soufre. On rencontre dans l'urine une série de corps que l'on peut classer de la façon suivante :

A. — COMPOSÉS A SOUFRE COMPLÈTEMENT OXYDÉ.

Ils comprennent, d'une part, des *sulfates minéraux*, d'autre part, des *esters-sulfates* qui se différencient par la nature du noyau conjugué à l'acide sulfurique ; ce sont :

a) *les phényl et crésyl-sulfates* dont l'existence fut démontrée par Städeler vers 1850, et qui furent isolés plus tard par Baumann.

b) *Les indoxyl-sulfates*, isolés par Baeyer, et dans lesquels Brieger, Kühne, Maillard reconnurent l'existence et la nature du noyau de l'indoxyle,



Les sulfocyanures ou sulfocyanates sont, à l'état de traces, des constituants normaux de l'urine.

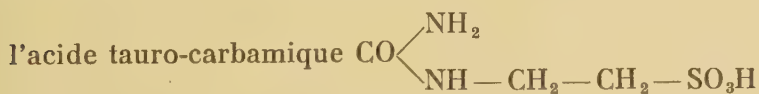
Quelques auteurs ont signalé la présence des hyposulfites ou thiosulfates dans l'urine de l'homme. Si ces corps soufrés sont des constituants normaux de l'urine du chien et du chat, nous n'en avons jamais rencontré dans toutes nos expériences. Par la méthode actuelle de dosage du soufre, cet élément ne peut être transformé en sulfate par la calcination.

B. — COMPOSÉS A SOUFRE INCOMPLÈTEMENT OXYDÉ.

Ces corps correspondent au soufre sulfonique et ont pour formule générale $R-SO_2OH$. Ce sont :



et plus particulièrement son dérivé :



Enfin, des polypeptides dont la présence a été démontrée récemment, par MM. Lefèvre et Rangier (34 et 35), dans l'adialysable urinaire et qui représentent avec l'acide tauro-carbamique 64,4 % du soufre organique total. Ils ont pour formule générale $R-CONH...CH_2-SO_2OH$ et cons-

tituent certainement la majorité, sinon la totalité des acides oxyprotéiques décrits par un certain nombre d'auteurs et étudiés surtout jusqu'à présent au point de vue de l'azote.

C. — COMPOSÉS A SOUFRE NEUTRE.

La *cystine* n'existe normalement dans l'urine qu'en très faible quantité et le représentant le plus important de ce groupe est la matière colorante jaune ou *urochrome* qui peut exister sous deux formes : une forme oxydée et une forme réduite. Dans leur belle étude sur l'adialysable urinaire, dont fait partie l'urochrome, MM. Lefèvre et Rangier (*loc. cit.*) ont pu établir l'existence de dérivés polypeptidiques à soufre cystinique



qui représentent avec la cystine 25 % du soufre organique urinaire et de dérivés polypeptidiques méthioniques



qui avec les traces de méthionine présentes constituent 11 % du soufre organique total.

Pour terminer, citons l'existence possible, dans l'urine, de corps volatils soufrés représentés par les mercaptans, d'odeur caractéristique, rencontrés après l'ingestion de certains aliments tels que les asperges.

Enfin, dans certaines intoxications par les dérivés monohalogénés du benzène, on retrouve, dans l'urine, des acides mercapturiques provenant de la conjugaison de la cystine avec ces substances.

CHAPITRE II

Etude de l'action de l'eau régale sur une série de corps organiques soufrés.

L'eau régale, obtenue en mélangeant les acides azotique et chlorhydrique en diverses proportions, a été utilisée en toxicologie pour la destruction des matières organiques. C'est l'eau régale obtenue en mélangeant volumes égaux d'acide chlorhydrique ($D = 1,19$ à $22-23^{\circ}B$) et d'acide azotique ($D = 1,33$ à $36^{\circ}B$) qui nous a servi comme agent préliminaire de destruction de l'urine.

Les tissus tels que le tissu musculaire, la peau, les cartilages, les productions épithéliales et l'on peut dire tous les tissus, même la substance cérébrale, sont solubilisés. Les matières grasses surnagent.

Le glucose, après 48 heures de contact, se dissout entièrement dans l'eau régale et après évaporation à sec on obtient un très faible résidu présentant l'aspect du caramel.

L'amidon est aussi presque entièrement détruit ; une expérience identique faite avec le blanc d'œuf donne un résidu ne contenant ni urée ni acides aminés. La réaction de Nessler est négative, car nous verrons que cet oxydant agit par désamination. Une expérience faite avec du jaune d'œuf nous a conduit à une destruction à peu près totale et, dans le résidu, nous avons confirmé les constatations précédentes, et nous avons pu y caractériser directement d'une façon très nette, le phosphore des lécithines sous forme de phosphates précipitables par le réactif molybdique, le soufre par le chlorure de baryum, enfin, le fer

provenant de la destruction de l'hématogène de Bunge, par le ferrocyanure et le sulfocyanure de potassium.

L'eau régale sera donc un excellent agent de destruction préliminaire de l'urine qui nous permettra de nous débarrasser d'une gangue glucosée et organique très importante.

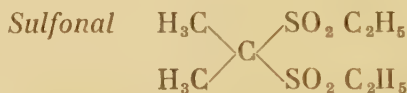
Mais, étant donné le but que nous poursuivons, il est intéressant d'étudier maintenant les produits intermédiaires d'oxydation des corps soufrés auxquels il conduit.

A) COMPOSÉS A SOUFRE COMPLÈTEMENT OXYDÉ.

L'eau régale sera sans action sur les sulfates que l'on retrouvera intégralement à la fin de l'opération.

B) COMPOSÉS A SOUFRE INCOMPLÈTEMENT OXYDÉ.

a) Sulfones :



Lorsqu'on traite le sulfonal par l'eau régale, après 48 heures de contact à froid et évaporation à sec, pour chasser l'excès de chlore, d'acide azotique et d'acide chlorhydrique, on obtient un résidu très abondant. Si on reprend par l'eau et l'acide chlorhydrique on n'obtient aucun précipité par le chlorure de baryum. Cette expérience confirme les résultats antérieurement acquis, que les sulfones sont inattaquées par l'eau régale. On pouvait du reste prévoir ce résultat, puisque le permanganate de potassium en milieu alcalin, qui est le meilleur oxydant du soufre organique, est presque dénué d'action.



On observe avec la saccharine une réaction identique. L'eau régale ne produit aucune oxydation.

Ces composés du type sulfone ont du reste une stabilité remarquable vis-à-vis des oxydants en général, ce qui tient à leur structure moléculaire. C'est ainsi, par exemple, que l'azote de la saccharine n'est pas dosable par la méthode de Kjeldahl. Après 40 heures de destruction par l'acide sulfurique on ne retrouve dans le dosage que 5,21 % de l'azote alors que le chiffre théorique est de 7,6 %.

Les produits d'évaporation de l'eau régale provenant soit du sulfonal, soit de la saccharine, correspondent bien au corps initial. Nous n'avons pas procédé à l'analyse élémentaire du résidu, étant donné la difficulté que l'on éprouve à obtenir un corps pur exempt de chlore. Mais nous avons fait agir sur ces résidus le permanganate alcalin. La réaction terminée, nous n'avons pas eu de précipité, en quantité appréciable, par le chlorure de baryum.

Ces dérivés sulfoniques ont donc conservé leur structure initiale et si, sous l'influence de l'eau régale il y avait eu rupture de la molécule au niveau de SO_2 , pour donner un dérivé sulfonique, nous aurions obtenu quantitativement la transformation du soufre en acide sulfurique dans la seconde oxydation alcaline.

b) Sulfoniques.

La taurine est inattaquée par l'eau régale à froid, mais sous l'influence de la chaleur et, en particulier, pendant l'évaporation au bain-marie, une petite partie de son soufre est transformée en acide sulfurique, ce qui est facile à constater par la réaction au chlorure de baryum en milieu chlorhydrique.

Après évaporation à sec, dessiccation dans le vide sulfurique, pour enlever les dernières traces d'acide et de chlore, nous avons repris par l'eau et neutralisé par le carbonate de baryum.

Après filtration et évaporation, on obtient, au fond du cristalliseur, de longues aiguilles enchevêtrées transparentes. Ces aiguilles cristallines sont constituées par de l'iséthionate de baryum qui cristallise comme tous les sulfoniques à l'état anhydre. En effet :

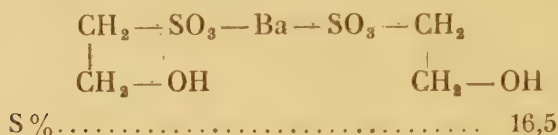
Dosage de l'azote (Kjeldahl).

La substance ne contient pas d'azote titrable par la méthode de Kjeldahl.

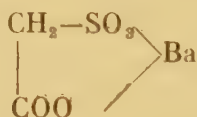
Dosage du soufre :

Poids de substance.....	0 g. 527
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 610
D'où S %.....	15,9

Calculé pour l'iséthionate de baryum.



Nous avons obtenu un nouveau précipité par addition de chlorure de baryum après l'oxydation permanganique. Cette constatation plaide en faveur de l'iséthionate de baryum, malgré la petite différence qui existe entre les chiffres obtenus et le chiffre théorique. S'il s'était formé, en effet, par oxydation de la fonction alcool primaire de l'acide sulfoacétique qui aurait donné du sulfoacétate de baryum :



pendant la deuxième oxydation, le carboxyle détruit aurait donné du gaz carbonique et le groupement sulfonique SO₃ qui saturait initialement une valence du baryum étant devenu SO₄, aurait neutralisé tout le baryum de la molécule pour donner SO₄Ba ; un excès de chlorure de baryum dans la liqueur chlorhydrique n'aurait pas donné de précipité. C'est précisément le contraire que nous avons observé. D'ailleurs, si nous effectuons le dosage du soufre sur une seconde prise d'essai oxydée par le permanganate alcalin, sans ajouter de chlorure de baryum pour saturer

tout l'acide sulfurique nous trouvons les chiffres suivants :

Poids de substance.....	0 g. 464
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 266
D'où S %.....	7,9

c'est-à-dire exactement la moitié du chiffre obtenu dans les premiers dosages.

Dosage du baryum (par calcination et oxydation par le mélange oxydant alcalin) :

Poids de substance.....	0 g. 503
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 309
D'où Ba %.....	36,2

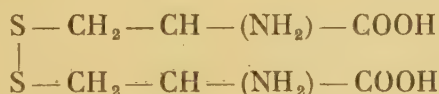
Calculé pour l'iséthionate de baryum : 35,4 %.

Le chiffre calculé d'après le baryum se trouve légèrement supérieur au chiffre théorique, ce qui s'explique par la présence de traces d'acide taurocholique ou cholalique provenant de la préparation de la taurine.

Nous retiendrons donc que l'eau régale agit sur la taurine en donnant de très petites quantités d'acide sulfurique et d'un acide sulfonique, l'acide iséthionique, provenant de la désamination de la taurine par le réactif. Nous aurons l'occasion à propos de la cystine de préciser le mécanisme de cette désamination.

C) COMPOSÉS SE RATTACHANT AU SOUFRE NEUTRE.

a) *Cystine*.



L'eau régale agissant sur la cystine, dans les conditions que nous avons précédemment décrites pour le sulfonal, oxyde une partie du soufre ; on obtient en effet, par l'acide chlorhydrique et le chlorure de baryum un abondant précipité de sulfate. Cependant la réaction est loin d'être totale. Nous avons procédé au dosage du soufre sur une prise d'essai. Résultats obtenus :

Poids de substance.....	0 g. 495
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 260
D'où S %.....	7,21
Calculé % : 26,66.	

Nous nous sommes demandé quelle était la substance qui prenait naissance au cours de cette oxydation. Dans ce but, nous avons oxydé 5 gr. de cystine par l'eau régale et nous avons évaporé à sec le produit d'oxydation au bain-marie. La cystine est, comme l'on sait, insoluble dans l'eau, de même dans l'eau régale, mais après quelques secondes de contact, une violente réaction se produit avec dégagement de chaleur et d'abondantes vapeurs nitreuses. Cette réaction dure quelques secondes et doit être effectuée dans un cristalliseur à bords élevés et à large surface.

Le produit provenant de l'évaporation à sec, au bain-marie, est desséché dans le vide sulfurique. Il se présente sous l'aspect d'un liquide visqueux, difficilement cristallisable, de réaction fortement acide. Il contient du reste de l'acide sulfurique libre. Sur une prise d'essai neutralisée par la lessive de soude, le réactif de Nessler ne donne qu'une réaction extrêmement faible. Il ne s'est pas produit de sels ammoniacaux au cours de la réaction. Le résidu, repris par l'eau, est neutralisé par agitation avec le carbonate de baryum et filtré. Dans cette opération, l'acide sulfurique reste sur le filtre sous forme de sulfate de baryum. Par évaporation du résidu et cristallisation, on obtient, au fond du cristalliseur une masse cristalline de coloration jaune ambré à peine translucide.

Ces cristaux ont été repris par l'eau, et soumis à une nouvelle cristallisation. Après dessiccation dans le vide sulfurique, nous avons procédé au dosage du soufre, de l'azote et du baryum.

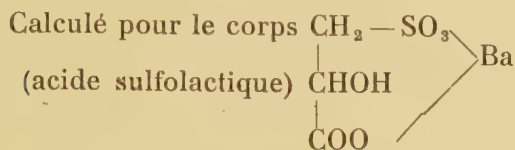
Voici les résultats obtenus :

Dosage de l'azote (Kjeldahl) :

Nous n'avons pas trouvé d'azote dosable par cette méthode.

Dosage du soufre (permanganate alcalin) :

	I	II
Poids de substance	0 g. 763	0 g. 734
SO ₄ Ba correspondant	0 g. 495	0 g. 453
D'où S %	8,90	8,47



S %	10,4
-----------	------

Dosage du baryum après calcination par le mélange oxydant alcalin et transformation en sulfate de baryum :

	I	II
Poids de substance	0 g. 742	0 g. 910
SO ₄ Ba correspondant	0 g. 4775	0 g. 564
D'où Ba %	37,73	36,37

Calculé pour l'acide sulfolactique :

Ba %	44,9
------------	------

Le produit obtenu est un mélange de sulfoniques ; les sulfonates de baryum cristallisent à l'état anhydre. Donc nous pensons que le constituant principal est le sulfolactate de baryum. Il n'y a pas, en effet, d'azote dans le produit de la réaction dont le premier temps serait non seulement l'oxydation du soufre, mais la désamination avec production d'un alcool, la réaction est identique à celle qui se passe avec certaines amines sous l'influence de l'acide nitreux :



corps instable dans la série grasse, qui donne, dans un second temps, $\text{R} - \text{N}_2\text{OH} = \text{R} - \text{OH} + \text{N}_2$.

Cependant, le chiffre de baryum obtenu diffère sensiblement du chiffre théorique ; d'ailleurs la proportion du soufre se trouve aussi abaissée par rapport aux chiffres théoriques correspondant au sulfolactate de baryum. Pour obtenir un produit pur, nous aurions dû procéder à des fractionne-

ments, ce qui serait sorti du cadre que nous nous étions tracé, puisque nous savons maintenant qu'il s'est formé, indépendamment de l'acide sulfurique, un dérivé sulfonique dosable par l'oxydation permanganique alcaline.

De ce qui précède, nous retiendrons deux faits importants : la *désamination*, d'une part et la *formation d'acide sulfurique* et *sulfolactique*, d'autre part. Par quel processus a eu lieu la désamination ? S'est-il formé de l'acide nitreux, comme l'ont prétendu certains auteurs, au cours de l'oxydation par l'eau régale ou le chlore naissant possède-t-il cette propriété ? Nous savons que le brome à froid donne, sur la cystine et la cystéine, de l'acide cystéinique. Il n'y a donc pas désamination. En est-il de même avec le chlore ? Dans ce but, nous avons fait agir sur la cystine, pendant 48 heures, un excès de chlore naissant obtenu par action de l'acide chlorhydrique sur le bioxyde de plomb.

Après avoir chassé le chlore par l'ébullition, nous avons précipité, après filtration, l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. Le nouveau filtrat fut soumis à une légère ébullition pour chasser l'hydrogène sulfuré.

La dessiccation à sec, au bain-marie, puis dans le vide sulfurique et l'action consécutive du carbonate de baryum, comme dans les conditions précédemment indiquées, nous ont conduit à un sulfonate de baryum dont nous avons déterminé la teneur en azote, soufre et baryum.

On obtient une masse cristalline identique, par son aspect, à celle obtenue avec l'eau régale.

Dosage de l'azote (Kjeldahl) :

Poids de substance.....	0 g. 021
HCl N/50 correspondant	4 cc. 18
D'où N %.....	5,57

Calculé pour la *cystéinate de baryum* :

N %.....	5,9
----------	-----

Il s'est donc formé, avec le chlore naissant, de l'acide cystéinique aux dépens de la cystine. D'ailleurs, le dosage du

soufre pratiqué sur une prise d'essai, nous a donné les résultats suivants :

Poids de substance.....	0 g. 346
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 307
D'où S %.....	12,21

Calculé pour le cystéinate de baryum : 13,4 %.

b) *Méthionine*. $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

Contrairement à la cystine, la méthionine est soluble dans l'eau. Cette propriété a permis sa découverte parmi les produits d'hydrolyse des protéines. L'eau régale donne avec cette substance, après quelques secondes de contact, une réaction énergique, avec dégagement gazeux, mais qui n'a rien de comparable à la réaction d'oxydation fournie par la cystine.

En opérant comme nous l'avons fait avec la cystine, c'est-à-dire avec évaporation à sec, la solution chlorhydrique ne donne qu'un très faible précipité de sulfate avec le chlorure de baryum. Le produit formé par l'action de l'eau régale après évaporation, est difficilement purifiable, ce qui tient à la présence de l'acide sulfurique qui a pris naissance au cours de l'oxydation.

Nous avons effectué sur ce résidu la transformation en dérivé barytique après avoir évaporé à sec, desséché dans le vide, repris par l'eau, neutralisé par le carbonate de baryum pour éliminer l'acide sulfurique, filtré et soumis à la cristallisation par évaporation.

Le produit obtenu se présente sous l'aspect d'une masse difficilement cristallisable, hygroscopique qui, après dessiccation dans le vide, nous a donné à l'analyse les résultats suivants.

Dosage de l'azote (Kjeldahl) :

La substance ne contient pas d'azote dosable par la méthode de Kjeldahl. On n'en trouve que des traces (environ 0,06 %). C'est-à-dire une quantité pratiquement négligeable, due à la présence de sels ammoniacaux.

Dosage du soufre (permanganate alcalin) :

Poids de substance.....	0 g. 456
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 143
D'où S %.....	4,31

Dosage du baryum (fusion oxydante alcaline) :

Poids de substance.....	0 g. 4565
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 143
D'où Ba %.....	24,63

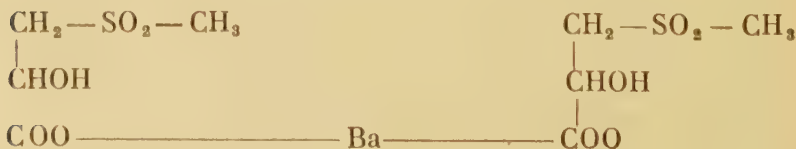
Les chiffres rapportés ci-dessus ne correspondent à aucune substance nettement définie ; d'autre part, étant donné la constitution chimique de la méthionine, le soufre se trouvant dans la molécule relié à deux atomes de carbone, nous pouvons prévoir la formation d'une sulfone, produit non azoté, dont l'extrémité de la chaîne serait constituée par le groupement —CH₂—SO₂—CH₃. Dans ces conditions, le soufre n'est plus dosable par la méthode au permanganate alcalin, et le chiffre de 4,31 trouvé est notablement inférieur au chiffre théorique. Pour le vérifier, nous avons dosé le soufre en partant d'un poids connu de substance initiale sur laquelle nous avons fait agir successivement l'eau régale, puis le permanganate alcalin et nous avons dosé l'acide sulfurique dans la liqueur chlorhydrique en le précipitant par le chlorure de baryum.

Voici les chiffres que nous avons obtenus :

Poids de substance.....	0 g. 460
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 144
D'où S %.....	4,282

Calculé pour la méthionine : 21,47 %.

Il s'est donc bien formé une sulfone ou un mélange de sulfones. Nous n'avons pas dosé la totalité du soufre, le chiffre 4,28 est notablement inférieur au chiffre théorique dans les deux dosages. Quant au chiffre obtenu pour le baryum, il se rapproche de celui correspondant à la substance :



Soit : 29 %.

et qui doit prédominer dans le mélange de produits obtenus.

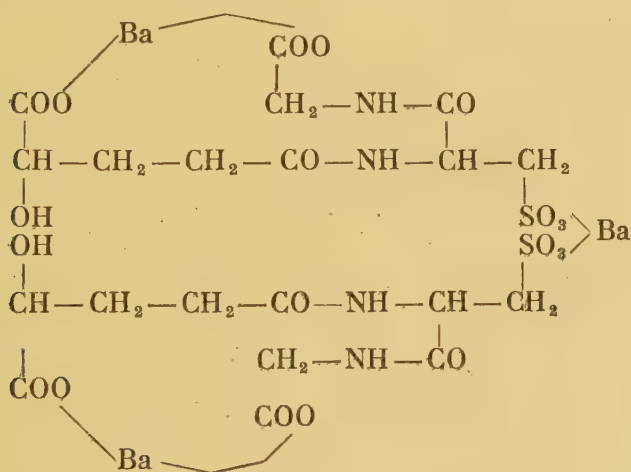
La méthode au permanganate, après action de l'eau régale, sera donc en défaut, puisqu'elle conduit à une sulfone.

d) *Glutathion*.

L'action de l'eau régale sur un polypeptide, le glutathion, conduit à un corps dont nous avons fait le dérivé barytique dans les conditions précédemment décrites. Voici les résultats obtenus :

Poids de substance.....	0 g. 011
HCl N/50 correspondant	4 cc. 11
D'où N %.....	6,46

Calculé pour le composé de formule :



N %.....	5 g. 01
----------	---------

Dosage du soufre :

		Calculé
Poids de substance.....	0 g. 2565	—
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 1045	
D'où S %.....	5,6	5,7 %
P. Desgrez		3

Dosage du baryum ;

Poids de substance.....	0 g. 429	
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 270	
D'où Ba %.....	37,01	36,5 %

Nous observons, suivant la règle générale, l'α désamination de la chaîne polypeptidique, les liaisons — CO — NH — ayant été respectées. Il y a formation du dérivé sulfonique du glutathion : corps qui se présente sous l'aspect d'une masse cristalline légèrement teintée de jaune. Les différences observées dans les chiffres tiennent à la présence d'impuretés qui ont pris naissance en même temps que la formation d'une petite quantité d'acide sulfurique lors de la dislocation de la molécule. L'azote en excès provient de la présence de sels ammoniacaux. En tous cas, tout le soufre sera dosable par l'action consécutive du permanganate, comme le montrent les résultats suivants :

Poids de substance.....	0 g. 165
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 130
D'où S %.....	10,80

Calculé pour le glutathion : 10,95 %.

e) *Sulfocyanure d'ammonium* — S = C = N — NH₄.

Sous l'influence de l'eau régale, la transformation du soufre en acide sulfurique est totale, même à froid.

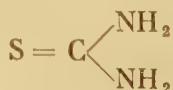
Après évaporation de l'eau régale au bain-marie, pour chasser l'acide azotique résiduel, on reprend par l'eau chlorhydrique, on ajoute le chlorure de baryum et on pèse le sulfate de baryum en s'entourant des précautions habituelles.

Voici les résultats obtenus :

Poids de substance.....	0 g. 356
SO ₄ Ba correspondant.....	1 g. 111
D'où S %.....	42,10

Calculé % : 42,10.

f) *Sulfo-urée*



La sulfo-rurée est un isomère du sulfocyanure d'ammonium et la transformation du soufre en acide sulfurique, est quantitative sous l'influence de l'eau régale.

Résultats obtenus :

Poids de substance	0 g. 695
SO ₄ Ba correspondant.....	1 g. 641
D'où S %.....	41,88
Calculé % :	42,10.



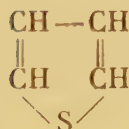
Poids de substance.....	0 g. 311
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 612
D'où S %.....	27,02
Calculé % :	27,21.

La transformation du soufre en acide sulfurique est encore quantitative, comme il est facile de le prévoir, la Thiosinamine étant un dérivé de la sulfo-rurée.

f) *Cas du soufre inclus dans un cycle.*

Dans le cas du soufre inclus dans un cycle, nous nous sommes demandés si l'action des deux réactifs d'oxydation, milieu acide et milieu alcalin, permettrait le dosage du soufre. Nous n'avons pas cherché, en effet, à isoler les produits intermédiaires de l'oxydation par l'eau régale, l'extraction du mélange par cristallisations fractionnées eut constitué pour nous une opération sortant du cadre que nous nous étions tracé. Nous nous bornerons simplement à signaler qu'avec le bleu de méthylène et la thionine, l'oxydation par l'eau régale conduit à une destruction incomplète et à la fin de l'évaporation on trouve un abondant dépôt de matières goudronneuses. En ce qui concerne le thiophène, la transformation par l'eau régale est aussi incomplète comme le montrent les résultats suivants :

Thiophène



Poids de substance.....	0 g. 692
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 900
D'où S %.....	17,849

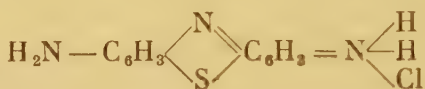
Calculé % : 38,09.

Après l'action consécutive du permanganate alcalin, nous obtenons les chiffres suivants :

Poids de substance.....	0 g. 3215
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 126
D'où S %.....	5,38

Calculé % : 38,09.

Thionine



Voici les chiffres obtenus après l'action de l'eau régale :

Poids de substance.....	0 g. 718
Sulfate de baryum.....	0 g. 416
D'où S %.....	7,95

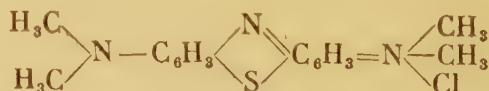
Calculé % : 12,14.

Après l'action consécutive du permanganate alcalin, nous obtenons les chiffres suivants :

Poids de substance.....	0 g. 314
Sulfate de baryum.....	0 g. 2756
D'où S %.....	12,04

Calculé % : 12,14.

Bleu de méthylène



Voici les chiffres obtenus après l'action de l'eau régale :

Poids de substance.....	0 g. 476
Sulfate de baryum correspondant...	0 g. 106
D'où S %.....	3,04

Calculé % : 10,01.

Après l'action consécutive du permanganate alcalin, nous obtenons les chiffres suivants :

Poids de substance.....	0 g. 410
Sulfate de baryum correspondant...	0 g. 291
D'où S %.....	9,7

Calculé % : 10,01.

Mode d'action de l'eau régale.

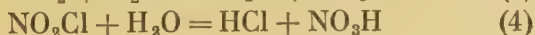
L'action de l'eau régale sur les substances organiques se fait à froid, on observe l'apparition de bulles gazeuses de chlore à la surface de contact de la substance et du liquide. Cette réaction est facile à observer lorsque l'on met un fragment de muscle dans l'eau régale. Tout se passe comme si les corps organiques étaient des catalyseurs de la décomposition de l'eau régale suivant l'équation.



qui s'observe en chimie minérale avec des substances possédant les affinités chimiques pour le chlore. Cette réaction ne s'effectue, seule, qu'à la température d'environ 50 degrés. A la température de distillation, l'eau régale se décompose avec la formation de chlore et de chlorure de nitrosyle suivant la réaction classique :



D'autres réactions secondaires ont été signalées :



Dans cette réaction, il y aurait formation de chlorure de nitrile provenant de l'action directe du chlore sur les vapeurs nitreuses.

D'une façon générale, l'eau régale produit par son chlore une oxydation directe ou indirecte. C'est là, la réaction fondamentale à froid. Nous avons vu, en effet, qu'avec la cystine donnant lieu à une réaction très violente, il se produit un dégagement abondant de vapeurs nitreuses. Nous signalerons cependant une propriété remarquable de l'eau régale qui n'avait pas été signalée jusqu'à ce jour. *C'est la désamination des acides aminés et des polypeptides* avec formation d'azote. Nous n'avons jamais observé la présence de sels ammoniacaux dans nos résidus de destruction. D'autre part, comme nous l'avons vu page 28, cette réaction ne saurait être imputable au chlore naissant qui donne avec la cystine de l'acide cystéinique.

La désamination, comme nous l'avons vu, s'effectue donc par l'acide azoteux, et cette réaction se produit en même temps que l'oxydation. Il ne saurait donc être question d'une réaction secondaire, la production d'acide azoteux serait comme celle du chlore une réaction fondamentale.

L'eau régale agirait donc, en définitive :

1° Par son chlore suivant l'équation (1) directement ou indirectement : $2\text{Cl} + \text{HOH} = 2\text{HCl} + \text{O}$ (formation d'acide cystéinique par le chlore naissant) ;

2° Par ses vapeurs nitreuses NO_2 qui donneraient, au contact de l'eau, de l'acide azoteux et de l'acide azotique suivant l'équation (3).

L'intensité avec laquelle se fait la désamination en est la preuve. A moins que cet acide azoteux provienne de la réduction du peroxyde d'azote qui agirait comme oxydant pour donner de l'anhydride azoteux N_2O_3 et de l'acide azoteux NO_2H .

Nous remarquerons, dans cette action, que l'azote fixé par des liaisons polypeptidiques reste inattaqué.

Sur le soufre, l'oxydation s'effectue par l'action indirecte du chlore, puisque l'eau de chlore agissant sur la cystine

conduit à l'acide cystéinique et elle se fait aussi par les vapeurs nitreuses et les dérivés nitrés. On sait, en effet, que l'acide azotique dilué possède des propriétés oxydantes identiques.

* * *

Conclusions.

Nous retiendrons que l'eau régale, comme agent de destruction préliminaire, sur les substances organiques soufrées conduit aux résultats suivants :

A. — *Les corps dans lesquels le soufre est complètement oxydé* (sulfates) seront inattaqués et l'acide sulfurique, étant peu volatil, se retrouvera dans les produits d'évaporation de l'eau régale.

B. — *Les corps à soufre incomplètement oxydé* (sulfoniques et sulfones) sont presque inattaqués par l'eau régale. Les sulfones se retrouvent dans le produit d'évaporation. Vis-à-vis des dérivés sulfoniques, l'attaque est nulle à froid. C'est seulement avec le concours de la chaleur et pendant l'évaporation au bain-marie que l'on retrouve des traces d'acide sulfurique.

C. — *a)* L'action de l'eau régale sur la cystine conduit à un dérivé sulfonique désaminé : l'acide sulfolactique associé à des traces de dérivés sulfoniques différents ;

b) La méthionine conduit à un mélange de sulfones provenant de l'oxydation du soufre placé entre deux carbones. Il se produit de très petites quantités d'acide sulfurique ;

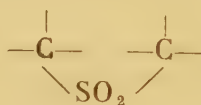
c) Le glutathion conduit à un dérivé dont la formule générale correspond à celle du glutathion dans lequel les groupements aminés NH_2 seraient remplacés par des oxyhydriles OH ;

d) Le sulfocyanure d'ammonium est complètement oxydé, le soufre se trouvant transformé en acide sulfurique ;

e) Il en est de même de la sulfo-urée ;

f) La thiosinamine est également complètement oxydée par l'eau régale.

D. — Les corps dont le soufre est inclus dans un cycle, tels le thiophène et le bleu de méthylène, cèdent simplement une partie de leur soufre qui est transformé en acide sulfurique sous l'influence de l'eau régale. Il se forme principalement une sulfone ou un mélange de sulfones, conformément à la règle générale et comme nous l'avons signalé pour la méthionine, à savoir : le soufre inclus dans une molécule entre deux carbones donne, sous l'influence des oxydants (le permanganate alcalin excepté), des sulfones de formule :



CHAPITRE III

Dosage du soufre urinaire par la méthode au permanganate alcalin après oxydation par l'eau régale.

Nous venons de voir que si l'eau régale, comme agent de destruction préliminaire, permet de se débarrasser d'une gangue organique considérable ; elle conduit, dans certains cas, avec la méthionine par exemple, à des sulfones, qui seront inattaquées par le permanganate alcalin. Examinons maintenant les corps soufrés que nous sommes susceptibles de rencontrer dans l'urine (voir page 18 et suiv.), et voyons si la méthode au permanganate alcalin, après destruction par l'eau régale, peut nous conduire au but que nous poursuivons. Les sulfocyanures seront transformés intégralement en acide sulfurique par l'eau régale ; la taurine et l'acide taurocarbamique resteront, en grande partie, à l'état de taurine, totalement oxydable par le permanganate alcalin, une faible proportion de soufre donnera de l'acide sulfurique sous l'influence de la chaleur.

La cystine est très peu soluble dans l'eau. Sa présence dans l'urine a été signalée dans certains cas de cystinurie. Quoi qu'il en soit, les produits ultimes de l'action de l'eau régale seront de l'acide sulfurique et de l'acide sulfolactique. Il en sera vraisemblablement de même des polypeptides soufrés dont le type est l'urochrome (forme bisulfure, $R_1-S-S-R_2$) et qui subiront un mode de destruction identique à celui du glutathion, en donnant naissance à de

l'acide sulfurique et à des sulfoniques attaquables par le permanganate alcalin.

Enfin, il reste la faible proportion de polypeptides méthioniques et la méthionine, partiellement transformés, il est vrai, en sulfones par l'eau régale et qui seront inattaquables par le permanganate alcalin. Nous nous sommes demandés, cependant, malgré cette légère cause d'erreur, si les résultats obtenus avec cette méthode étaient comparables à ceux que donne la calcination avec le mélange oxydant, d'abord à l'air, puis en vase clos, en tenant compte, cette fois, des produits volatilisés au cours de l'opération.

Si la méthode est ainsi cliniquement acceptable, avec les urines normales elle deviendrait applicable aux urines glycosuriques pour lesquelles nous cherchons un procédé de dosage du soufre total.

Ces considérations nous ont conduit, en première analyse, à adopter la technique suivante pour doser le soufre urinaire sous ses trois formes : elle ne diffère en rien de la technique classique de Salkowski en ce qui concerne le soufre des sulfates et le soufre des esters-sulfates.

TECHNIQUE :

Dosage du soufre des sulfates et des phénol-sulfates :

50 cc d'urine filtrée sont portés à l'ébullition pendant 15 minutes en présence de 5 cc d'acide chlorhydrique pur. Puis, on ajoute 10 cc d'une solution 1/10 de chlorure de baryum, on porte à l'ébullition, on filtre, on lave, on calcine et on pèse le précipité de sulfate de baryum obtenu (a).

Le soufre correspondant contenu dans 1 litre d'urine sera donné par la formule :

$$A = a \times 0,1373 \times 20$$

exprimé en ions $\text{SO}_4 = A' = a \times 0,412 \times 20$.

Dosage du soufre des phénol-sulfates :

125 cc d'urine sont additionnés de 125 cc d'un mélange de 2 parties de solution d'hydroxyde de baryum et d'un volume de solution de chlorure de baryum saturées à froid. On filtre et 200 cc du filtrat sont portés à l'ébullition une demi-heure en présence de 20 cc d'acide chlorhydrique pur. On filtre, on sèche et on pèse le précipité de sulfate de baryum (*p*).

Le poids *P* de soufre de phénols-sulfates contenu dans un litre d'urine est donné par la formule suivante :

$$P = p \times 0,1373 \times 10$$

$$\text{ou exprimé en ions SO}_4 \quad P' = p \times 0,412 \times 10.$$

Le soufre des sulfates s'en déduit facilement soit :

$$S \text{ des sulfates } \% = A - P.$$

Dosage du soufre total :

On traite 50 cc d'urine dans une capsule en porcelaine, par un mélange de 20 cc d'acide azotique et de 20 cc d'acide chlorhydrique et on laisse en contact à froid pendant au moins 24 heures (les expériences de mise au point ont porté sur des urines normales, mais la technique de destruction avec les urines de glycosuriques est identique). Evaporer ensuite presque à sec, l'évaporation complète étant impossible, puis reprendre par un peu d'eau chaude en lavant les parois de la capsule. Les liquides obtenus sont versés dans un ballon ou une fiole d'Erlenmeyer pouvant s'adapter à un réfrigérant ascendant et alcalinisés par de la lessive de soude de manière à avoir une réaction franchement alcaline, soit un excès d'environ 20 cc de lessive de soude. Cette opération terminée, on adapte la fiole au réfrigérant ascendant après avoir ajouté un excès d'une solution saturée de permanganate alcalin jusqu'à coloration franchement rouge violacé. On chauffe la fiole à une douce ébullition pendant 4 heures et on ajoute, s'il y a lieu, par l'extrémité

supérieure évasée en entonnoir, la solution de permanganate, de manière à avoir un excès de ce dernier réactif. Dans cette opération, pour éviter des projections, on aura soin de laisser refroidir l'appareil.

Cette opération terminée, et après refroidissement, on ajoute un excès d'acide chlorhydrique, on chauffe d'abord légèrement, puis à ébullition jusqu'à obtention d'un liquide parfaitement limpide. Avec certains verres, l'alcali dissout une petite quantité de silice ; on filtrera le précipité blanc floconneux s'il y a lieu. On ajoute un excès d'une solution saturée de chlorure de baryum et on porte à l'ébullition pendant environ 10 minutes. Par refroidissement, le précipité de sulfate de baryum se sédimente ; on le recueille et on le lave sur un filtre ne donnant pas de cendre. Filtre et précipité sont introduits dans un creuset et calcinés. Après refroidissement, on ajoute quelques gouttes d'acide azotique et on calcine à nouveau.

Du poids t de sulfate de baryum on déduit le poids du soufre en ions S par la formule :

$$T = t \times 0,1373 \times 20$$

ou en ions SO_4

$$T' = t \times 0,412 \times 20.$$

Dosage du soufre total par calcination en présence de mélange oxydant alcalin.

On dissout dans 50 cc d'urine 5 gr. du mélange oxydant et fondant constitué par 4 parties de nitrate de sodium et 1 partie de carbonate de sodium. On évapore à sec au bain-marie.

Le résidu est additionné de 8 gr du même mélange et on calcine au rouge lentement. On reprend après refroidissement par 30 à 40 cc d'eau bouillante additionnée de 5 cc d'acide chlorhydrique. On fait bouillir et on ajoute 10 cc d'une solution 1/10 de chlorure de baryum. On filtre, on lave et on calcine. On obtient le soufre total par les formules précédemment indiquées.

En l'exprimant en ions S par litre d'urine :

$$T = t \times 0,1373 \times 20$$

ou en ions SO_4 par litre d'urine

$$T' = t \times 0,412 \times 20.$$

Sur une série de dix urines normales (la forme du soufre étant identique dans les urines normales et les urines glycosuriques) nous avons dosé le soufre total par calcination avec le mélange oxydant puis par le permanganate alcalin après destruction par l'eau régale.

Voici les chiffres obtenus :

Numéro d'ordre	Calcination	Permanganate
Urine n° I.....	2 g. 167	2 g. 707
— II.....	2 g. 394	2 g. 460
— III.....	3 g. 629	3 g. 744
— IV.....	2 g. 822	2 g. 954
— V.....	3 g. 621	3 g. 744
— VI.....	2 g. 839	2 g. 905
— VII.....	2 g. 905	2 g. 779
— VIII.....	3 g. 506	3 g. 580
— IX.....	2 g. 741	2 g. 815
— X.....	3 g. 374	3 g. 489

Soufre total exprimé en ions SO_4 par 24 heures.

En examinant les résultats obtenus, nous voyons que la méthode au permanganate alcalin donne des chiffres sensiblement supérieurs à la méthode par voie sèche. Par conséquent, même avec des urines normales, si la calcination est bien conduite, aisément réalisable sans projections, il y a toujours des pertes par volatilisation de corps organiques soufrés avant que le mélange oxydant soit entré en action.

Nous avons pensé qu'il serait utile de mettre ces pertes en évidence. Dans ce but, un appareil a été construit, destiné à opérer la calcination en vase clos, de manière à recueillir et à doser les produits soufrés provenant de la volatilisation.

Description de l'appareil : voir schéma.

L'appareil comprend :

- 1° un flacon laveur A ;
- 2° un matras B en verre de bohême et à long col, d'environ 500 cc de capacité ;
- 3° un réfrigérant C ;
- 4° une allonge D refroidie ;
- 5° un deuxième flacon laveur E en communication avec une trompe à vide.

Les flacons A et E renferment une solution à 1 % de permanganate alcalin.

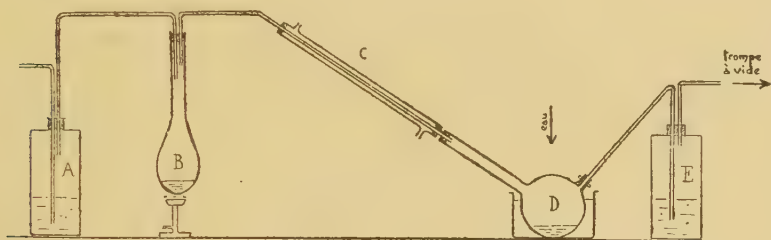
Fonctionnement de l'appareil.

On opère sur 100 cc d'urine qu'on introduit dans le matras B après y avoir ajouté 4 gr de carbonate de sodium desséché et 16 gr de nitrate de sodium sec ; on rince avec un peu d'eau distillée le col du matras, et on l'adapte au bouchon de liège qui le relie au reste de l'appareil.

Le flacon laveur A a pour effet de retenir les produits soufrés pouvant provenir de l'atmosphère du laboratoire. La conduite de l'opération est très simple. On commence à chauffer le matras B, de manière à maintenir une légère ébullition, en même temps que la trompe est mise en action de manière à obtenir une ébullition régulière et un courant d'entraînement lent et continu réalisant dans l'appareil un vide partiel très faible. Lorsque tout le liquide a distillé, il est facile de s'assurer, par des prises d'essai, que le liquide de condensation D et celui du flacon laveur E ne contiennent pas de soufre. Une ébullition avec le permanganate alcalin puis, l'ébullition directe avec l'acide chlorhydrique et le chlorure de baryum ne donnent aucun précipité. Dès lors on peut se débarrasser du liquide de condensation D qui ne présente aucun intérêt. L'appareil étant remonté après avoir été lavé, on procède à la calcination de la masse cristalline contenue dans le matras après avoir mis la trompe en action. Quand la masse commence à charbonner, il se

dégage des vapeurs blanchâtres dont une partie se condense dans le réfrigérant C et le flacon D sous l'aspect d'une huile jaunâtre.

On continue à chauffer et lorsque la masse commence à entrer en fusion, l'atmosphère du matras s'éclaircit et les matières organiques brûlent rapidement. Lorsque l'opération est terminée et que le contenu du matras se présente sous l'aspect d'un liquide mobile, parfaitement limpide et peu coloré, on cesse de chauffer et, lorsque le ballon est refroidi, on arrête la trompe.



On recueille le liquide contenu dans le flacon D et dans le flacon laveur E. Puis, après les avoir réunis, on y ajoute les eaux provenant du lavage du réfrigérant C et des deux flacons D et E. On dose sur ces liquides le soufre par la méthode ordinaire au permanganate alcalin ci-dessus décrite. Nous avons répété l'opération que nous venons d'indiquer avec le même appareil, chaque fois sur 100 cc de 5 urines différentes. Voici les chiffres obtenus pour le contenu du matras et pour les produits de condensation. Nous y avons ajouté le dosage du soufre total sur une autre fraction de 100 cc effectué par la méthode au permanganate.

No d'ordre des urines	S exprimé en SO_4 pour 100 cc. d'urine		
	Soufre total par la méthode au permanganate	Soufre total resté dans le matras	Soufre total volatilisé
I	0 g. 271	0 g. 256	0 g. 011
II	0 g. 449	0 g. 428	0 g. 015
III	0 g. 544	0 g. 512	0 g. 019
IV	0 g. 502	0 g. 484	0 g. 018
V	0 g. 437	0 g. 422	0 g. 017

Si nous totalisons le soufre resté dans le matras et le soufre volatilisé, nous obtenons les chiffres suivants :

I.....	0 g. 267
II.....	0 g. 443
III.....	0 g. 531
IV.....	0 g. 502
V.....	0 g. 439

qui coïncident sensiblement avec ceux obtenus par la méthode au permanganate.

Il résulte de cette série d'expériences que la calcination simple occasionne des pertes même avec les urines normales. Cependant, les écarts observés sont très faibles, de l'ordre de 10 à 20 cgr au maximum, ce qui explique que la calcination ait pu donner, avec les urines normales, des résultats cliniquement acceptables ; mais, comme nous l'avons vu au début de ce travail, elle est inutilisable avec les urines des glycosuriques. Nous nous sommes demandé quelle pouvait être la nature des produits volatilisés. C'est ce que nous allons étudier au cours du chapitre qui va suivre. Nous nous bornerons pour l'instant aux conclusions suivantes :

La méthode à l'eau régale, suivie d'une destruction au permanganate alcalin, donne d'excellents résultats ; elle est aisément utilisable avec les urines normales.

Nous avons effectué quelques dosages sur des urines fortement glycosuriques et, si nous ne retenons pas, pour l'instant, les résultats obtenus nous pouvons dire qu'elle conduit aussi au but que nous poursuivons.

Cependant, nous remarquerons que la méthode est longue et délicate. Si elle est aisément réalisable, ce n'est pas une méthode clinique. La destruction permanganique et la précipitation du sulfate de baryum sont des opérations rendues très longues, vraisemblablement par des produits dont la destruction n'a pas été complète (restes de chaînes polypeptiques présentant le caractère d'acides gras de haute condensation et autres produits mal définis qui stabilisent l'émulsion de sulfate de baryum et rendent difficile et long son lavage).

C'est pour cette raison que nous avons été conduit à abandonner cette méthode dans la pratique courante pour décrire celle qui va suivre. C'est précisément l'étude de l'action du mélange oxydant alcalin sur une série de corps soufrés qui nous a permis d'atteindre le but que nous poursuivons.

CHAPITRE IV

Etude de la méthode par calcination après action de l'eau régale.

Dans le but d'établir la nature des pertes qui survenaient au cours de la calcination de l'urine par le mélange oxydant alcalin, nous avons été amené à étudier l'action de ce réactif sur la série suivante de corps organiques soufrés.

A. — Corps dans lesquels le soufre est complètement oxydé :

Les sulfates alcalins n'étant pas volatils à la température à laquelle s'effectue l'oxydation, nous avons jugé inutile de faire cette étude systématique, car il est évident que les esters-sulfates, phénolsulfates, indoxyl-sulfates, etc... donneront, comme terme fondamental de l'oxydation, des sulfates alcalins stables.

B. — Corps dans lesquels le soufre est incomplètement oxydé :

Après avoir introduit dans une capsule en porcelaine des poids connus de substance avec environ 4 fois leur poids du mélange oxydant alcalin, nous avons effectué la fusion oxydante, puis le dosage du soufre ; voici les chiffres obtenus :

a) Sulfonal :

Poids de substance.....	0 g. 5485
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 422
D'où S %.....	10,56

Calculé % : 28,07.

b) Nous n'avons pas effectué de dosage sur la saccharine, étant donné la facilité avec laquelle elle se volatilise, puisqu'il suffit d'en chauffer une petite quantité dans une capsule pour percevoir à distance une saveur nettement sucrée.

c) Sulfoniques.

Taurine :

Poids de substance.....	0 g. 547
SO ₄ Ba correspondant.....	1 g. 032
D'où S %.....	25,02

Calculé % : 25,32.

Nous n'avons pas effectué de dosage sur des sulfoniques de plus haute condensation que la taurine, tel que le glutathion sulfonique désaminé dont nous avons indiqué le mode de préparation. Nous n'avons été arrêté dans cette opération que par le prix élevé de la substance.

Nous remarquerons que, puisque la taurine, qui est le terme le plus simple de la série des sulfoniques urinaires, possède un soufre dosable par calcination oxydante, les sulfoniques urinaires de haute condensation « *a fortiori* », seront dosables de même par cette méthode.

C. — Corps se rattachant au soufre neutre :

a) *Cystine :*

Poids de substance.....	0 g. 576
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 589
D'où S %.....	13,88

Calculé % : 26,66.

b) *Méthionine :*

	I	II
Poids de substance.....	0 g. 548	0 g. 249
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 771	0 g. 315
D'où S %.....	19,3	17,5

Calculé % : 21,4.

c) *Sulfo-cyanure d'ammonium* :

Poids de substance.....	0 g. 315
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 606
D'où S %.....	26,34

Calculé % : 41,96.

d) *Sulfo-urée* : étant un isomère du sulfocyanure d'ammonium, nous pouvons prévoir de grosses pertes lors de la calcination, avec vraisemblablement transformation en sulfocyanure sous l'influence de la chaleur, la réaction étant réversible.

Si nous nous reportons maintenant à l'étude que nous avons faite au début de ce travail sur l'action de l'eau régale vis-à-vis d'une série de corps organiques soufrés, et si nous effectuons la calcination après action de l'eau régale, nous retrouverons quantitativement le soufre sur les corps suivants :

A. — Sulfates : aucun changement.

B. — a) Les sulfones demeureront inattaquées par l'eau régale et seront volatilisées en grande partie lors de la calcination, mais il n'y en a pas dans l'urine humaine ;

b) Les sulfoniques n'auront qu'une faible partie de leur soufre transformée en acide sulfurique par l'eau régale ; lors de la fusion oxydante le reste du soufre sera transformé quantitativement en acide sulfurique. Ceci est vrai pour la taurine et les dérivés sulfoniques de haute condensation que l'on pourrait rencontrer dans l'urine.

C. — Les corps à soufre non oxydé donneront les résultats suivants :

a) la cystine, sous l'action de l'eau régale, donnera de l'acide sulfurique et de l'acide sulfolactique. C'est-à-dire un sulfonique que l'on peut prévoir dosable par le mélange oxydant. Quoi qu'il en soit, nous avons jugé utile de vérifier cette manière de voir par le dosage suivant :

Poids de substance.....	0 g. 300
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 558
D'où S %.....	26,7

Calculé % : 26,66.

Nous avons effectué le même dosage, c'est-à-dire eau régale et fusion oxydante, sur le glutathion. Résultats :

Poids de substance.....	0 g. 353
SO ₄ Ba correspondant.....	0 g. 282
D'où S %.....	10,99

Calculé % : 10,95.

Donc tous les représentants du soufre non oxydé urinaire qui comprend la cystine, et un ensemble assez mal défini de corps dont le type est l'urochrome de formule générale R—S—S—R, seront transformés en sulfoniques par l'eau régale et le soufre non complètement oxydé au cours de cette opération donnera, par la fusion oxydante, de l'acide sulfurique. Il reste les polypeptides méthioniques qui donneront par l'eau régale partiellement des sulfones de haute condensation, peu volatiles pendant l'oxydation par calcination.

En résumé, tous les corps soufrés urinaires seront dosables par la fusion alcaline oxydante après l'oxydation par l'eau régale. S'il en est ainsi, et si après avoir fait agir sur une série de cinq urines l'eau régale dans les conditions que nous avons indiquées, après évaporation, la calcination oxydante ne doit pas nous donner de pertes. Nous avons opéré de la façon suivante :

100 cc d'urine sont placés dans le matras B (voir p. 46) et additionnés de 80 cc d'eau régale. On laisse en contact à froid pendant 48 heures. On ajoute alors lentement et avec précaution d'abord de la lessive de soude pour neutraliser l'acidité en excès, puis 4 gr de bicarbonate de sodium (l'acide carbonique en excès empêche la rupture du matras). Ensuite l'opération est conduite comme il a été indiqué p. 46.

L'opération terminée, ébullition, calcination, refroidissement, etc.... nous n'avons pas constaté la présence de corps soufrés volatils dans les liquides E et D ainsi que dans les produits de lavage. L'oxydation permanganique ne nous a pas permis de déceler de soufre précipitable par le chlorure de baryum. Nous n'avons même pas, sur la

plus grande partie de ces liquides, après neutralisation par la soude, évaporation et calcination en présence de mélange oxydant alcalin, retrouvé de traces de soufre. Si, en effet des sulfones volatilisées, non dosables par le permanganate alcalin, s'étaient condensées dans les récipients E et D, au cours d'une seconde calcination après évaporation, nous aurions retrouvé 20 % environ du soufre, or, nous n'en avons pas pu déceler la moindre trace.

Enfin, les deux méthodes : la méthode par calcination et la méthode au permanganate alcalin seul, sans action préliminaire de l'eau régale, doivent donner sur des urines des résultats sensiblement concordants. C'est ce que l'expérience vérifie sur la série de 5 urines normales et de 10 urines glycosuriques suivantes :

URINES NORMALES

Numéro d'ordre	Soufre total exprimé en ions SO_4 par 24 heures	
	Permanganate	Calcination
I	3 g. 05	3 g. 00
II	1 g. 68	1 g. 63
III	2 g. 51	2 g. 55
IV	2 g. 14	2 g. 05
V	2 g. 24	2 g. 44

URINES GLYCOSURIQUES

Numéro d'ordre	Taux de glucose par litre	Soufre total exprimé en ions SO_4 par 24 heures	
		Permanganate	Calcination
I	53 g.	1 g. 718	1 g. 62
II	18 g.	2 g. 205	2 g. 28
III	107 g.	2 g. 365	2 g. 27
IV	23 g.	3 g. 71	3 g. 66
V	29 g.	2 g. 16	2 g. 26
VI	48 g.	2 g. 32	2 g. 25
VII	39 g.	2 g. 61	2 g. 69
VIII	13 g.	1 g. 93	1 g. 90
IX	47 g.	4 g. 01	4 g. 07
X	27 g.	3 g. 24	3 g. 22

Conclusions

Les expériences précédentes nous ont conduit à adopter, pour le dosage du soufre dans les urines des glycosuriques, la technique suivante :

Dosage du soufre des sulfates et phénol-sulfates :

50 cc d'urine filtrée sont portés à ébullition pendant 15 minutes, en présence de 5 cc d'acide chlorhydrique pur. Puis, on ajoute 10 cc d'une solution 1/10 de chlorure de baryum. On porte à l'ébullition, on filtre, on lave, on calcine et on pèse (a) le sulfate obtenu.

Le soufre correspondant, contenu dans un litre d'urine, sera donné par la formule :

$$A = a \times 0,1373 \times 20$$

ou exprimé en ions SO_4

$$A' = a \times 0,412 \times 20.$$

Dosage du soufre des phénol-sulfates :

125 cc d'urine sont additionnés de 125 cc d'un mélange constitué par 2 parties de solution saturée d'hydroxyde de baryum et d'une partie d'une solution saturée de chlorure de baryum. On filtre et 200 cc de filtrat sont portés à l'ébullition une demi-heure, en présence de 20 cc d'acide chlorhydrique pur. On filtre, sèche et pèse le poids p du précipité de sulfate.

Le poids P de soufre de phénol-sulfate contenu dans un litre d'urine est donné par la formule suivante :

$$P = p \times 0,1373 \times 10$$

ou exprimé en ions SO_4

$$P' = p \times 0,412 \times 10.$$

Soufre des sulfates :

Le soufre des sulfates se déduit aisément des chiffres obtenus :

Exprimés en soufre par litre :

$$S \text{ des sulfates p. litre} = A - P$$

exprimés en SO_4 :

$$\text{SO}_4 \text{ des sulfates p. litre} = A' - P'$$

Dosage du soufre total :

On additionne 50 cc d'urine de 40 cc d'un mélange à parties égales d'acides azotique et chlorhydrique purs. On laisse en contact pendant 24 heures. On évapore ensuite à sec et on reprend le résidu par 50 cc d'eau chaude, en ayant soin de bien laver les parois de la capsule ; on alcalinise par la lessive de soude jusqu'à coloration franchement rouge de la phtaléine dont on a ajouté IV gouttes de solution à 1 p. 100. On ajoute alors 2 gr de bicarbonate de sodium qui neutralisera l'excès de soude par transformation en carbonate, et favorisera la bonne marche de la calcination et 5 gr du mélange oxydant alcalin dont nous avons indiqué la formule. On évapore à sec, on ajoute au résidu 8 gr de mélange fondant et on calcine à chaleur modérée. Le produit de la calcination est dissous par 50 cc d'eau chaude additionnée de 10 cc d'acide chlorhydrique pur. On fait bouillir et on verse dans cette solution 10 cc d'une solution bouillante de chlorure de baryum à 1/10. Le sulfate de baryum précipité est recueilli sur un filtre, lavé à l'eau bouillante jusqu'à élimination complète des chlorures, calciné et pesé, soit t le poids obtenu. Les formules suivantes donnent le soufre exprimé en ions S par litre d'urine :

$$T = t \times 0,1373 \times 20$$

et en ions SO_4 par litre :

$$T' = t \times 0,412 \times 20.$$

CHAPITRE V

Nous avons envisagé d'étendre aux tissus la méthode de dosage que nous venons d'exposer pour les urines des glycosuriques. Le procédé de destruction par l'eau régale s'applique très bien aux substances biologiques animales et nous avons pu détruire d'une façon complète tous les organes ou fractions d'organes. Cependant, un certain nombre de petites variantes avaient dû être mises en œuvre : la substance animale était laissée en contact avec le liquide oxydant pendant un temps variable dont la limite était indiquée par la disparition presque complète du produit. Ensuite l'ensemble était porté à l'ébullition dans un matras muni d'un réfrigérant ascendant, puis filtré et les graisses restant sur le filtre reprises par l'eau chaude à plusieurs reprises. L'opération de destruction était enfin terminée comme dans le cas des urines. Mais, malheureusement, la méthode de dosage du soufre par calcination du résidu en présence de mélange oxydant alcalin n'est pas applicable.

En effet, si l'urine ne contient guère que des polypeptides du type méthionine, de haute condensation, donnant par l'eau régale des sulfones peu volatiles au cours de la calcination avec le mélange oxydant, il n'en est pas de même des substances biologiques surtout celles d'origine animale (Baerstein). La kératine de la corne, l'ovalbumine, contiennent 4,4 % de méthionine, la lactalbumine 2,6 %, la fibrine 2,4 %. Or, si nous nous reportons à l'action de la calcination par le mélange oxydant alcalin consécutive à l'action de l'eau régale sur la méthionine (voir page 51), on n'obtient jamais, pour le pourcentage en soufre, le chiffre théorique.

La volatilisation de corps organiques soufrés ou même de la sulfone de la méthionine est beaucoup plus faible qu'avec les sulfones en général (sulfonal, saccharine), mais elle s'effectue cependant d'une façon très nette.

L'erreur sur le chiffre théorique est éminemment variable. De 2 % dans le premier dosage (eau régale permanganate) et de 3,9 % dans le second (eau régale, calcination). Elle ne peut être atténuée par aucun coefficient de correction.

La méthode de destruction par l'eau régale suivie de la calcination par le mélange oxydant alcalin est donc inutilisable pour les substances biologiques animales.

Conclusions

Nous avons, au cours de ce travail, et dans le but d'établir un procédé de dosage du soufre dans les urines des glycosuriques, étudié l'action de l'eau régale sur une série de corps organiques soufrés en isolant les produits de la réaction.

Nous avons établi un fait fondamental, l' α désamination des acides aminés et de polypeptides, ce qui nous a permis d'expliquer l'action de l'eau régale comme agent de destruction de la matière organique. Nous avons mis en évidence l'action de l'acide azoteux comme agent d'oxydation principal.

Les produits isolés sont, pour la cystine et le glutathion, des dérivés sulfoniques désaminés sous l'influence de l'acide azoteux avec transformation du groupement NH_2 en groupement OH . Dans ce mode d'action les liaisons polypeptidiques sont inattaquées. On peut ainsi prévoir, pour les dérivés soufrés de haute concentration $\text{R}_1 - \text{S} - \text{S} - \text{R}_2$, la formation de chaînes polypeptidiques désaminées avec formation de sulfoniques correspondant $\text{R}_1 - \text{SO}_3\text{H}$, $\text{R}_2 - \text{SO}_3\text{H}$.

La taurine perd son azote par un mécanisme identique pour donner de l'acide iséthionique.

Les acides sulfoniques de haute condensation $\text{R} - \text{SO}_3\text{H}$ donnent des réactions identiques par désamination et transformation du groupement NH_2 en groupement alcool secondaire OH .

La méthionine, dans laquelle le soufre est situé entre deux groupements carbonés, fait exception à cette règle générale, à savoir formation de sulfoniques et désamina-

tion, pour donner naissance à une sulfone qui, comme nous le savons, n'est plus oxydable par le permanganate alcalin.

Les sulfocyanures ont leur soufre transformé quantitativement en acide sulfurique. Il en est de même de la sulfourée et de la thiosinnamine.

Enfin, si le soufre inclus dans un cycle (thionine, thiophène, bleu de méthylène) est dosable directement par le permanganate alcalin, il ne l'est plus après l'action préliminaire de l'eau régale, ce qui nous a conduit à admettre la formation de sulfones que nous n'avons pas cherché à isoler du mélange goudronneux provenant de la réaction.

Les sulfones sont inattaquées par l'eau régale, ce qui confirme les résultats antérieurement acquis.

* * *

La méthode de destruction permanganique, après l'action préliminaire de l'eau régale sur des urines, nous a conduit aux résultats suivants : Le dosage du soufre s'effectue sans pertes sensibles, mais la méthode est longue et délicate. En particulier, la destruction par le permanganate alcalin et la précipitation du sulfate de baryum exigent quelquefois plusieurs jours.

La comparaison, sur des urines normales, de la méthode que nous avons décrite et de la méthode par calcination simple avec le mélange oxydant alcalin, fait apparaître de légères pertes de corps volatils soufrés pendant la calcination. Les erreurs sont cependant si faibles que la dernière méthode par calcination simple reste cliniquement utilisable avec les urines normales.

* * *

La méthode que nous préconisons pour doser le soufre urinaire dans les urines glycosuriques, qui donne aussi d'excellents résultats sans pertes de soufre avec les urines normales, est la méthode par calcination par le mélange

fondant alcalin après oxydation préliminaire par l'eau régale et dont la description a été donnée page 56.

*
* *

Nous avons essayé de généraliser la méthode, de manière à l'appliquer au dosage du soufre dans les substances biologiques, en particulier dans les organes, tissus, fragments d'organes ou de tissus, etc... En pareils cas elle n'est pas applicable. La méthionine donne une sulfone par action de l'eau régale. Contrairement aux dérivés sulfoniques particulièrement stables, cette substance donne lieu, sous l'action du mélange oxydant alcalin, à des pertes par volatilisation que l'on ne peut évaluer par aucun coefficient de correction.

Vu : le Président de la thèse,
M. POLONOVSKI.

Vu : le Doyen,
M. TIFFENEAU.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

1. SALKOWSKI (E.). — Virchow's Arch. f. path. Anat., 1879, 551.
2. — Maly's Jahresb. d. Thierchem., 1880, 10, 257.
3. — Ztschr. f. physiol. Chem., 1886, 10, 346.
4. MOHR (P.). — Ztschr. f. physiol. Chem., 1895, 20, 556.
5. SCHULZ (H.). — Pflüger's Archiv., 1894, 57, 1907, 121, 114.
6. KONSCHIEGG (A.). — Pflüger's Archiv., 1908, 123, 274.
7. BAUZIL. — Journ. de Pharm. et Chimie, 1908, t. 17, p. 189.
8. BENEDICT (S. R.). — Jour. Biol. Chem., 1909, 6, 363, 7, 101.
9. DENIS (W.). — Jour. Biol. Chem., 1910, 8, 401.
10. KONARSKY. — Biochem. Z., 187, 398, 402, 1927.
11. MODRAKOWSKI (G.). — Ztschr. f. physiol. Chem., 1903, 38, 562.
12. OSBORNE (T.). — Ztschr. f. anal. Chem., vol. 41, 25.
13. FOLIN (O.). — Journ. Am. Chem. Soc., 1909, 31, 284.
14. ABDERHALDEN and FUNK. — Ztschr. f. physiol. Chem., 1908, 58, 331; 1909, 59, 121.
15. CORDIER (L.). — Journ. Pharm. et Chim., 1917, 16, 360, 363; 1918, 17, 193.
16. STOCKHOLM (M.) and KOCH (F. C.). — Journ. Am. Chem. Soc., 1923, 45, 1953.
17. DOUMER (E.) et LIMOZIN (R.). — Compt. Rend. Soc. de biol., 1914, 76, 799.
18. SHERMAN (H. C.). — Journ. Am. Chem. Soc., vol. 24, 1100.
19. WOLF et OESTERBERG. — Biochem. Ztschr., 1910, 29, 429.
20. ROMANI. — Giorn. Chim. Med., 3, 41, 6, 1922.
21. Avery method for determination of sulfur. Sulfur metabolism of Kahn and Goodridge. Philadelphia and New-York, 1926.
22. LESURE et DUNEZ. — Journ. de Pharm. et Chim., 1929, X, p. 433.

23. LESURE et THOMAS. — Journ. de Pharm. et Chim., 1933, t. 17, p. 114.
24. FOLIN. — Am. Journ. of Phys., t. 9, p. 265, 1903.
25. LIEBESNY. — Biochem. Zeit., t. 105, p. 43, 1920.
26. ROBISON (R.). — Biochem. Journ., t. 16, p. 134-136, 1922.
27. DENIS et REED. — Journ. de Pharm. et Chim., t. 7, p. 351, 1928.
28. BOUTWEL-TOEPFER. — Soc. Chim. France, 1933, t. 54, p. 2079.
29. REVAL et FERRAND. — Soc. Chim. biol., 1935, t. XVII, p. 1451.
30. FRIEDRICH BAUER. — Z. physiol. Chem., 228, 61-76, 1934.
31. WARTH et KRISHNAU. — Indian J. Vet. Sci., 5, 210, 15, 1935.
32. LEFÈVRE (C.) et RANGIER (M.). — Oxydat. du soufre en chimie organique. Application à son dosage. Journ. de Pharm. et de Chimie, 1935, t. XXI, p. 151.
33. FISCHER et ZERWECK. — Z. physiol. Chem., 1924, 137, 176.
34. LEFÈVRE (C.) et RANGIER (M.). — Journ. de Pharm. et de Chimie, 1938, t. XXVII, p. 154.
35. — Journ. de Pharm. et de Chimie, 1938, t. XXVII, p. 204.

